

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-176973

(43)Date of publication of application : 25.06.2002

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

(21)Application number : 2000-404227

(71)Applicant : SAITO SHIGEO

(22)Date of filing : 14.12.2000

(72)Inventor : SAITO SHIGEO

(54) MAMMALIAN EMBRYONIC STEM CELL AND METHOD FOR ESTABLISHING THE SAME AND SUBCULTURE METHOD FOR THE SAME

(57)Abstract:

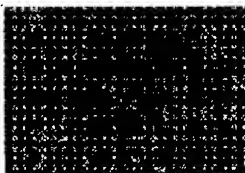
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide multifunctional embryonic stem cells, to provide a method for establishing the stem cells, and to provide a subculture method for the embryonic stem cells.

SOLUTION: The objective mammalian embryonic stem cells are characterized by having all of the following cell biological characteristics:

(1) derived from blastodermic embryos, (2) continuing the a proliferation in an undifferentiated condition, (3) expressing a sugar chain SSEA-1 antigen, (4) alkali phosphatase activity is positive, (5) expressing transcription factor Oct 3/4, and (6) having multidifferentiation potency.

The method for establishing the embryonic stem cells comprises culturing cells obtained from the inner cell mass of mammalian blastodermic embryos on a feeder of umbilical cord endothelial cells isolated from an umbilical cord by the use of fetal bovine serum-containing MEM α as the medium to form a colony. The subculture method for the embryonic stem cells is also provided.

図1



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-176973

(P2002-176973A)

(43) 公開日 平成14年6月25日 (2002.6.25)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

データベース (参考)

E 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数9 書面 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2000-404227(P2000-404227)

(22) 出願日 平成12年12月14日 (2000. 12. 14)

(71) 出願人 501031208

齋藤 成夫

栃木県矢板市片岡2095番地20

(72) 発明者 齋藤 成夫

栃木県矢板市片岡2095番地20

Fターム (参考) 4B065 AA90X BB19 BB25 BB34

CA44 CA60

(54) 【発明の名称】 哺乳動物胚性幹細胞とその樹立方法並びにその継代培養方法

(57) 【要約】

【課題】多能性を有する胚性幹細胞とその樹立方法、並びにその胚性幹細胞の継代培養方法の提供。

【解決手段】以下の細胞生物学的特徴 (1) 胚盤胞期胚由来であること、(2) 未分化状態での増殖を続けること、(3) 糖鎖 SSEA-1 抗原が発現すること、

(4) アルカリフォスファターゼ活性が陽性であること、(5) 転写因子 Oct 3/4 が発現すること、

(6) 多分化能を持つこと、の全てを有することを特徴とする哺乳動物胚性幹細胞と、哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清を含有する MEM α を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で培養しコロニーを形成する胚性幹細胞の樹立方法、並びに継代培養方法。

図面代用写真



【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の細胞生物学的特徴 (1) 胚盤胞期胚由来であること、(2) 未分化状態での増殖を継続すること、(3) 糖鎖 SSEA-1 抗原が発現すること、(4) アルカリフォスファターゼ活性が陽性であること、(5) 転写因子 Oct 3/4 が発現すること、(6) 多分化能を持つこと、の全てを有することと特徴とする哺乳動物胚性幹細胞。

【請求項2】哺乳動物がラット、ウシ及びウマである請求項1の胚性幹細胞。

【請求項3】哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清を含有する MEMα を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で培養しコロニーを形成させることを特徴とする胚性幹細胞の樹立方法。

【請求項4】哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清を含有する MEMα を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で培養しコロニーを形成させ、このコロニーを未分化状態での増殖能、糖鎖 SSEA-1 抗原の発現性、アルカリフォスファターゼ活性の有無、Oct 3/4 の発現性、多分化能の有無、を指標にスクリーニングすることを特徴とする胚性幹細胞の樹立方法。

【請求項5】哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清、上皮細胞成長因子、白血病阻害因子を含有する MEMα 培地で培養する請求項3または4の胚性幹細胞の樹立方法。

【請求項6】哺乳動物がラット、ウシ及びウマである請求項3から5のいずれかの胚性幹細胞の樹立方法。

【請求項7】哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清を含有する MEMα を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で初代培養してコロニーを形成させ、トリプシン EDTA 溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がし、剥がした細胞を PBS 溶液と共に遠心分離器にかけることで洗浄し、個々の細胞に分散させた後、上記初代培養に用いた培地で再培養することを特徴とする胚性幹細胞の継代培養法。

【請求項8】哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清、上皮細胞成長因子、白血病阻害因子を含有する MEMα 培地で初代培養する請求項7の胚性幹細胞の継代培養方法。

【請求項9】哺乳動物がラット、ウシ及びウマである請求項7か8のいずれかの胚性幹細胞の継代培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は胚性幹細胞とその樹立方法並びにその胚性幹細胞の継代培養方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は胚性幹細胞から臓器へ、臓器から個体へと分化する細胞生物学的、分子生物学的な制御転換機能解明のための研究材料とし

て、或いは異種間移植用の臓器作出のための医療材料として、また胚性幹細胞は、高い頻度で外来遺伝子との相同組み換えが起こる可能性があるため、有用医薬品のバイオリアクターなる組み換えクローン動物を生産するためのドナー細胞として有益な胚性幹細胞とその樹立方法、並びにその胚性幹細胞を継代培養する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生物個体への分化能を示す培養細胞としてのマウス胚性幹細胞が発見されて以来、この胚性幹細胞を用いた組織・器官の再生、胚の発生機序の追求、クローン化個体の作出を目指した発生学がクローズアップされ、次世代の医学及びバイオテクノロジーの目指す方向性の一つとして期待されている。

【0003】1998年にアメリカの研究者グループがヒトにおける胚性幹細胞の樹立を初めて報告して以来 (Thompson TA, et al., Science 282, 1145-1147, 1998; Shambloott MJ, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 13726-13731, 1998)、胚性幹細胞がヒトの神経系、血球系、臓器等の再生医療や遺伝子治療に道を開く万能細胞として俄然世の関心を浴びる様になってきた。しかしながら、マウス以外の動物種では胚性幹細胞 (或いは胚性幹様細胞) を用いた生殖系列キメラの作出は未だ成功しておらず (Stices, et al., Biol. Reprod. 48, 715-719, 1996; Strelchenko N, Theriogenology, 37, 111-126, 1996)、体外で胚性幹細胞の遺伝子操作を行い、形質転換された幹細胞を介し、組み換え個体の生産が可能なものも今のところマウスに限られている (Bradley A, et al., Nature, 399, 255, 1998)。

【0004】Strelchenko は前出の論文でウシの胚性幹様細胞を樹立し、この細胞をドナー核として核移植を行い、クローン胚をレシピエント牛に移植したところ妊娠5日で流産したと報告している。しかし、本発明者が幹細胞の特徴として挙げたアルカリフォスファターゼの発現は陰性であり、その他の条件もクリアしていない様である。また Campbell らは、ヒンジで embryonic disc 由来の培養細胞からのクローン産仔の作出に成功したが (Nature, 380, 64-66, 1996)、胚性幹細胞の特徴であるアルカリフォスファターゼの発現性や糖鎖 SSEA-1 抗体の発現性に関しては記述しておらず、embryonic disc 由来の細胞は形態的にも上皮様細胞の様である。

【0005】Strelchenko, Campbell らは胚性幹様細胞の培養を行う為に、胎児繊維芽細胞

3

株であるマウス STO かマウス胎児由来の初代繊維芽細胞を用いている。胚性幹細胞の維持に使われる初代繊維芽細胞は始原生殖細胞の二次培養以降に使える細胞株が得られるが、初代培養に使うと継代出来ないとしており (Stewart, CL, et al., Dev. Biol. 161, 626-628, 1994)、ウシやヒツジなど家畜種の胚性幹細胞樹立のために、その初代繊維芽細胞を用いたことが幹細胞の樹立を妨げた可能性が高いと考えられる。また胚性幹細胞は白血病阻害因子存在下において未分化状態が維持され、細胞の増殖を促されることが知られている。しかしながら、白血病阻害因子を加えてもマウス以外の霊長類や家畜種胚性幹細胞の樹立には成功しておらず、未知の増殖因子が存在しているのかもしれない。

【0006】以上の通り、マウスやヒト以外には胚性幹細胞の樹立された動物種は確認されておらず、胚性幹細胞を特定するうえで不可欠な糖鎖 SSEA-1 が発現することや体外培養系で多分化能を持つこと等が証明された報告はない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は以上の様な事情を勘案してなされたものであり、マウスやヒト以外の胚性幹細胞を提供することを目的としている。またこの発明はそれらの細胞を樹立するための方法と、それらの細胞を体系的に培養するための方法を提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】この発明はまず、上記の課題を解決するものとして、以下の細胞生物学的特徴、

(1) 胚盤胞期胚由来であること、(2) 未分化状態での増殖を継続すること、(3) 糖鎖 SSEA-1 抗原が発現すること、(4) アルカリフォスファターゼ活性が陽性であること、(5) 転写因子 Oct 3/4 が発現すること、(6) 多分化能を持つこと、の全てを有することを特徴とする、哺乳動物胚性幹細胞を提供する。

【0009】またこの発明は、哺乳動物胚の内細胞塊から得られた細胞を牛胎児血清を含有する MEM α を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で培養しコロニーを形成させるか、または、このコロニーをアルカリフォスファターゼ活性の有無、糖鎖 SSEA-1 抗原の発現性、Oct 3/4 の発現性、多分化能の有無、未分化状態での増殖性、を指標にスクリーニングすることの特徴とする、胚性幹細胞の樹立方法を提供する。

【0010】さらにこの発明は、哺乳動物胚性幹細胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を、牛胎児血清を含有する MEM α を培地とし、臍帯より分離した臍帯内皮細胞のフィーダー上で初代培養してコロニーを形成させ、0.25%トリプシン 0.1% EDTA 溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がし、剥がした細胞を PBS

4

溶液と共に遠心分離器にかけることで洗浄し、個々の細胞に分散させた後、上記初代培養に用いた培地で再培養することを特徴とする、胚性幹細胞の継代培養法を提供する。

【0011】なお、上記の胚性幹細胞の樹立方法、及び、その継代培養法においては、哺乳動物胚盤胞期胚の内細胞塊から得られた細胞を、牛胎児血清、上皮細胞成長因子、白血病阻害因子を含有する MEM α の培地で培養することを好ましい態様としてもいる。

【0012】

【発明実施の形態】まず、この発明の胚性幹細胞の樹立方法に関してさらに詳しく説明する。通常、胚性幹細胞を樹立するためには、マイトマイシン処理するか、 γ 放射線を照射し細胞分裂を停止させたマウス STO フィーダー細胞が必要である。この発明では臍帯内皮細胞をフィーダーに用いる。培養培地には牛胎児血清 (FCS)、白血病阻害因子 (LIF) を含有させる。また上皮細胞成長因子 (EGF) は胚性幹細胞コロニーの形成に必須ではないが、胚性幹細胞を株化するのに顕著な効果があり、細胞の増殖因子として、培養培地に添加することが重要である。臍帯細胞をフィーダーとして用い、培養培地に EGF を添加することは、胚性幹細胞の増殖に対し相乗的に働き、細胞株の樹立を可能にする。

【0013】これらの成分の培地中への添加量は、例えば FCS は 5~10%、LIF は 10~50 ng/ml、EGF は 10~50 ng/ml 程度とすることが出来る。培養は 5% CO $_2$ 条件下で 39℃前後の温度で行う。以上の通りの培養により、胚性幹細胞のコロニーが得られる。さらに、これらのコロニーを形成する細胞に対しては、例えば糖鎖 SSEA-1 抗原が発現すること、アルカリフォスファターゼが陽性であること、転写因子 Oct 3/4 が発現すること、多分化能を持つこと、を指標としてスクリーニングすることによって、胚性幹細胞としての機能を確認することが出来る。

【0014】例えば SSEA-1 抗原の発現性は、細胞を SSEA-1 抗体で染色してからフローサイトメトリで分離することにより確認することが出来る。多分化能を持つことは、培養系で神経細胞に分化させ、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、Nestin 抗体マーカーで染色してその多分化能を確認することが出来る。さらに胚性幹細胞を除核した体外培養由来の未受精卵に核移植し、更に体外培養することにより胚盤胞に発達させ、これを受胚雌の子宮に移植することにより妊娠させることで確認することも可能である。

【0015】次に、この発明における胚性幹細胞の継代培養法に関して説明する。この方法は、上記の樹立方法によって得た胚性幹細胞のコロニー (初代培養細胞) を培養器から剥がし、別の培養器において再培養し、増殖させる方法である。コロニーを剥がす際には、培養器か

50

5

ら培養地を取り除いた後、0.1~0.25%程度のトリプシンEDTA液を添加し、約39℃で6分間程度処理することにより、フィーダー細胞と共にコロニーを剥がすことが出来る。これを予め細胞分裂を抑制された臍帯内皮細胞由来の初代培養に用いたものと同様の培地(すなわちFCS、LIF、EGFを含有する培地)で培養することによって、コロニーをフィーダーに接着させ、再度増殖させることが出来る。継代培養に使用する細胞以外は、定法に従って液体窒素中で凍結保存も出来る。

【0016】以上の通りこの発明の方法はヒトをはじめとする全ての哺乳動物の胚性幹細胞の樹立に適用することが出来、様々な動物種から胚性幹細胞を樹立すること、並びにそれらの胚性幹細胞を継代的に培養することが出来る。そして例えばブタやウシ、ウマの胚性幹細胞は異種移植用の臓器の作成に利用することが出来たり、有用医薬品のバイオリアクターとなる組み換えクローン動物生産に活用出来、再生医学やバイオテクノロジーの発展に多大な貢献が期待される。

【0017】以下、実施例を示し、この発明の幹細胞樹立方法をさらに詳細かつ具体的に説明すると共に、この方法によって得られた胚性幹細胞についても試験結果を示してその特徴を解説する。しかしながら、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0018】

【実施例】実施例1この発明の胚性幹細胞を以下の方法により取得し、その細胞を生物学的特性を試験した。

【0019】(1)臍帯内皮細胞の分離、培養法並びにフィーダー細胞としての準備に関して記す。ウシ新生子の臍帯を滅菌した外科用鉗で約1cm²に切断し、70%エタノールを噴霧し、火炎滅菌を行った後、抗生物質添加PBS(-)(Dulbecco、Ca、Mg不含)で数回洗浄した(ペニシリン2000単位/ml; 明治製薬、ストレプトマイシン100μg/ml; 明治製薬、ファンゴゾン25μg/ml; GIBCO BRL)。更に滅菌ベトリ皿上で上記サンプルを1mm²程度に細切後、3mlの0.25%トリプシン0.1% EDTA (GIBCO BRL)で10分間処理した。このサンプルの入ったトリプシン液を5mlのPBS

(-)で希釈後、遠心分離(1000rpm、5分間)し、沈殿を5mlのPBS(-)で懸濁し再度同条件で遠心分離した。得られた沈殿を10%のFCS (GIBCO BRL)と抗生物質を含有したMEMα (GIBCO BRL) 3mlの入った培養皿(ブライマリア、ファルコン、6cm径)に入れ、38.6℃、5%CO₂の条件下で培養を行った。培養3~4日後に細切された臍帯サンプルの周囲に内皮細胞がコロニーとなって出現した。コンフルエントに至る迄更に7~10日培養後、臍帯サンプル塊を除去後、継代培養を行った。培地は2日に1度新しいものと交換する。継代細胞をPB

6

S(-)で2回洗浄後数分間トリプシンEDTA処理をし、6cmの培養皿に約1/5の濃度で細胞を蒔くことで行った。4日後にほぼコンフルエントに達した。2~3回継代を繰り返した後、既法に従い凍結保存した。フィーダーとして用いる時には凍結細胞を融解後新たに培養を始めた。フィーダー細胞の作成手順。aコンフルエントに近い臍帯内皮細胞に、10μg/mlとなるようマイトマイシン(Sigma)を加え、3~4時間培養した。b培地を除きPBS(-)で3回洗浄し、トリプシン処理を行い細胞を剥がした後、遠心分離した(1000rpm、5分間)。細胞を2×10⁶/mlの濃度に懸濁した。c4穴培養皿(Nunc)に1穴当たり0.5mlの懸濁液を滴下した。一般的なフィーダー細胞となる、作成後2日以降のものを胚性幹細胞の樹立のために使用した。

【0020】(2)胚性幹細胞の樹立並びに培養予め凍結保存された胚を既法に従い融解した後、試験に供した。ラットにおいては交尾確認後4日目の胚盤胞期胚をウシ及びウマにおいてはそれぞれ人工授精または自然交配後7日目の胚盤胞期胚を用いた。全ての胚盤胞から顕微手術により内細胞塊(ICM)部分を切り出し、フィーダー細胞上で培養を行った。20ng/ml EGF (Sigma)、20ng/ml LIF (Sigma)を加えたMEMα(10%FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有)中で、38.6℃、5%CO₂条件下で培養を続けた。培地は2日に1度交換した。フィーダー上のICMは1~2日でフィーダーに接着し、増殖を続けた。培養4~5日後には周囲に細胞コロニーが発達してきた。更に培養を続け、コロニーの直径が3000~4000μmになった時点でピペットを用いてフィーダーより剥がし、トリプシン液でおよそ6~7分間処理した後、ガラスピペットを用い細胞を解離した。解離後はPBS(-)で希釈後遠心分離を2回行って洗浄した後、得られた沈殿を上記と同じ培養条件でフィーダー細胞上に1/3濃度で蒔いた(初代培養)。

【0021】(3)試験方法胚性幹細胞の指標の1つとなる形態を位相差顕微鏡下で観察し、未分化状態での増殖を調べた。未分化細胞としての特徴であるアルカリフォスファターゼ活性はfast red TR塩(Sigma)含有のNaphthol AS MX Phosphate (Sigma)で染色することによって検出した。胚性幹細胞の未分化マーカーSSFA-1抗原の発現は、抗SSFA-1抗体染色によりフローサイトメトリー(fluorescence activated cell sorter; FACS)を用いSSFA-1抗体と結合する幹細胞集団の分離を試みた。すなわちラット胚性幹細胞2×10⁶個を抗ラットIgG及び抗マウスSSFA-1抗体と反応後、FITC(fluorescein isothiocyanate)標識ウサギ抗マウスIgGで二次染色しFACSに

で解析した。またウシ胚性幹細胞 2×10^5 個を抗ウシ IgG及び抗マウスSSEA-1抗体と反応後、FITC標識ウサギ抗マウスIgGで二次染色しFACSにて解析した。更にウマにおいても胚性幹細胞 2×10^5 個を抗マウスIgG及び抗マウスSSEA-1抗体と反応後、ラット、ウシと同様に二次染色し、FACSにて解析した。マウスの未分化細胞を同定するのに用いられる転写因子Oct3/4の検出をPCR法により行った。胚性幹細胞の多分化能を調べるため、得られた幹細胞を神経系細胞へと分化させ、星状膠細胞、神経幹細胞の細胞マーカー抗体であるGFAP、Nestin抗体で細胞免疫化学的にそれらの検出を試みた。すなわち、ウマ、ラット胚性幹細胞をEGF、繊維芽細胞成長因子(FGF)2、FGF9含有MEM α 培地で3回継代培養し、グリア細胞が観察された時点で、マウス抗Nestin抗体と反応後アルカリフォスファターゼ共役抗マウスIgG抗体と二次反応させ、Fast redで染色した。また同様にEGF、FGF2、FGF9含有培地で3回継代培養した後、これらサイトカインを除去し、更に7日間培養した時点で、ウサギ抗GFAP抗体と反応後、アルカリフォスファターゼ共役抗ウサギIgG抗体と二次反応させ、同様に染色した。更にウシ胚性幹細胞の多分化能を調べるため、幹細胞をドナー核とし、核移植を実施し、クローン胚を作出した後、受胚雌に移植した。培地への添加因子であるEGF、LIFをそれぞれ1種、及び、両方を除いたコントロール培地で、継代3~4代のウマ胚性幹細胞の培養を行い、添加因子の細胞増殖への作用を調べた。又、フィーダー細胞の幹細胞樹立に対する効果を調べるため、フィーダー細胞無しでウシICMの培養を行い、対照と比較した。

【0022】(4)試験結果上記(2)の条件で培養のウシ胚性幹細胞クローン胚発生率

	a	b(b/a)	c(c/b)
実験 継代数	供試胚数	融合数(%)	胚盤胞数(%) 移植頭数 受胎数(%)*
1	11	153	87(56.9)
2	12	110	92(83.6)
3	12	122	98(80.3)
計	385	277(71.9)	61(22.0) 30 17(56.7)

*：超着床妊娠診断による。

【0026】更にウシ胚性幹細胞をドナー核として用いた核移植胚の妊娠率は表2に示した。このことにより細胞核の多能性も確認出来た。

【0027】以上図1~11、表1、2に示したように本発明で樹立した細胞株は、多分化能を有する胚性幹細胞としての特徴を完全に示すことが確認出来た。

【0028】図12に明らかなように、EGF、LIF

結果、図1~3の位相差顕微鏡写真に示した様にマウス胚性幹細胞と酷似した細胞同士が密に凝集した胚性幹細胞コロニーが得られた。初代培養ではコンフルエントに達するのに7~10日間を要した。アルカリフォスファターゼ活性は陽性であった(図4、5、6)。胚性幹細胞の抗マウスSSEA-1抗体陽性細胞の割合は図7、8、9で示してある。ラットは24.5%、ウシが10.2%、ウマは38.4%の割合となり、動物種間で差があることが示唆された。

【0023】

【表1】

樹立した各細胞株のOct3/4の検出結果

細胞株	Oct3/4
ラット WDA 1	+
ウシ WA 3	+
ウマ EK 1	+
ウシ 蹄帯内皮	-

表1から明らかなように、全ての動物種の胚性幹細胞でOct3/4が陽性であった。

【0024】次に胚性幹細胞の多分化能を示す証拠としてウマ胚性幹細胞から星状膠細胞マーカーGFAP抗体陽性細胞(図10)、及び神経幹細胞マーカーNestin抗体陽性細胞(図11)が体外培養系により作出された。この結果により、ウマ胚性幹細胞が多能性を有することが証明された。ラット胚性幹細胞でも同様の結果が得られた。

【0025】

【表2】

共に除いたコントロールでは、1週間培養を続けてもコンフルエントに達しないのに対し、EGF単独で加えた系では4日で、EGF・LIFを組み合わせると更に3日で、コンフルエントに達する顕著な増殖効果が認められた。

【0029】

【表4】

	フィーダー細胞 (+)	フィーダー細胞 (-)
ICM数	9	10
細胞株樹立数(%)	5(56)	0

* : 培地はBGF、LIF、添加MEM α + 10%FCSを用いた。

【0030】表4に明らかなように、フィーダー細胞の存在無しではウシ胚性幹細胞の樹立は不可能であったが、フィーダー細胞を用いることでICM9個中5個(56%)が幹細胞として樹立され、フィーダー細胞を使用することが胚性幹細胞樹立には必須であることが示唆された。

【0031】実施例2実施例1で得た胚性幹細胞を、以下の方法により継代培養した。フィーダー細胞上でコンフルエントに達したウシ胚性幹細胞の培養皿から培地を取り除いた後、0.25%トリプシン0.1%EDTA 20で6~10分間処理し、胚性幹細胞とフィーダー細胞とを溶液中に分散させた。この懸濁液を2回遠心分離し(1000rpm、5分間)、得られた沈殿を継代培養に用いたものと同様の組成からなる培地に 2×10^5 個/ml濃度で蒔いたところ、細胞は培養皿上での活発な分裂、増殖が観察され(図13)、ほぼ4~5日でコンフルエントに達した。

【0032】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって胚性幹細胞とこの細胞を樹立するための方法、並びにこの胚性幹細胞を継代的に培養する方法が提供される。このことにより、幹細胞の再生、分化機構の解明や異種移植用の臓器の作成、有用医薬品のバイオリアクターとなる組み換えクローン動物生産に活用することが可能となり、再生医学やバイオテクノロジーの発展に資することが期待出来る。

【図面の簡単な説明】

【図1】ラット胚性幹細胞コロニー顕微鏡写真200倍。

【図2】ウシ胚性幹細胞コロニー顕微鏡写真200倍。

【図3】ウマ胚性幹細胞コロニー顕微鏡写真100倍。

【図4】ラット胚性幹細胞コロニーアルカリフォスファターゼ染色顕微鏡写真200倍。

【図5】ウシ胚性幹細胞コロニーアルカリフォスファターゼ染色顕微鏡写真200倍。

【図6】ウマ胚性幹細胞コロニーアルカリフォスファターゼ染色顕微鏡写真200倍。

【図7】抗SSEA-1抗体によるラット胚性幹細胞のFACSの結果。黒く塗られた領域が陽性細胞の割合。

【図8】抗SSEA-1抗体によるウシ胚性幹細胞のFACSの結果。黒く塗られた領域が陽性細胞の割合。

【図9】抗SSEA-1抗体によるウマ胚性幹細胞のFACSの結果。黒く塗られた領域が陽性細胞の割合。

【図10】ウマ胚性幹細胞由来GFAP抗体陽性細胞顕微鏡写真100倍。

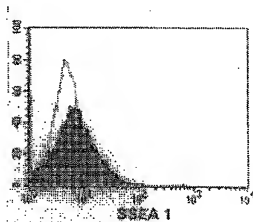
【図11】ウマ胚性幹細胞由来Nestin抗体陽性細胞顕微鏡写真200倍。

【図12】細胞増殖因子がウマ胚性幹細胞増殖に及ぼす影響を示したグラフ。

【図13】ウシ胚性幹細胞(継代数5)顕微鏡写真200倍。

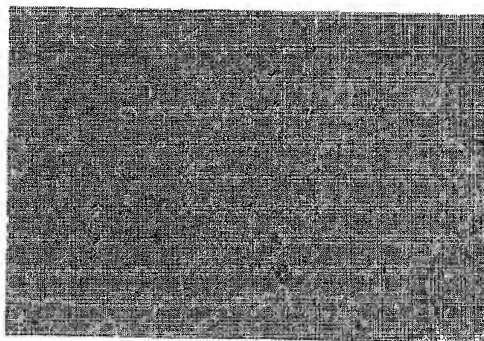
【図7】

図面代用写真



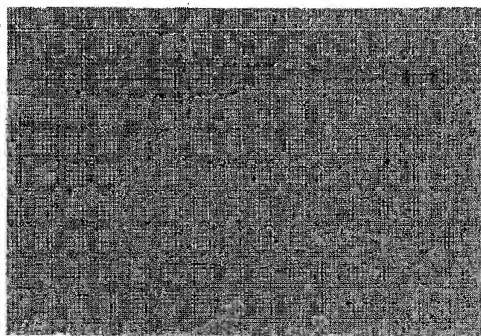
【図1】

図面代用写真



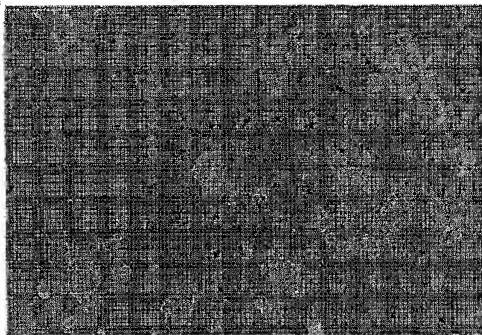
【図2】

図面代用写真



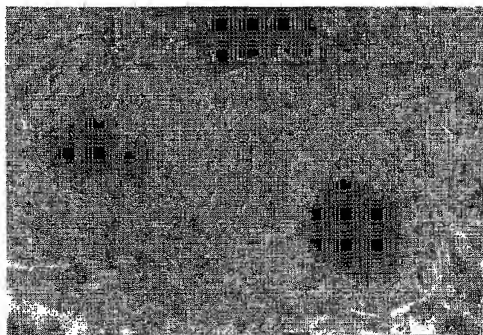
【図 3】

図面代用写真



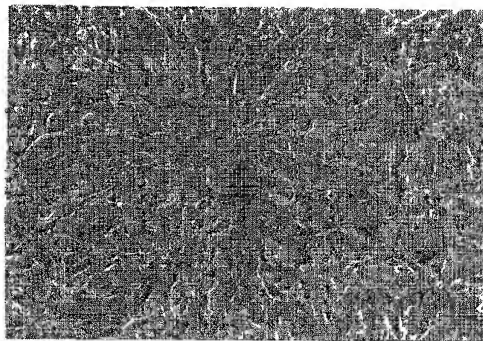
【図 4】

図面代用写真



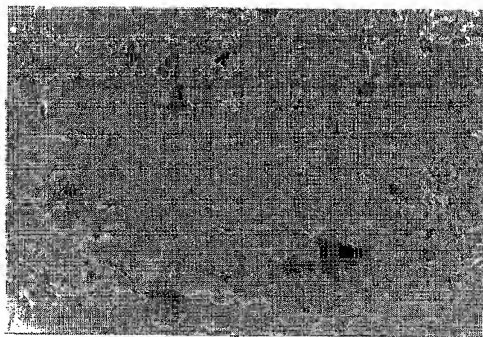
【図5】

図面代用写真



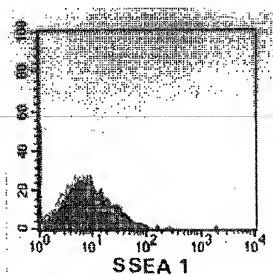
【図6】

図面代用写真



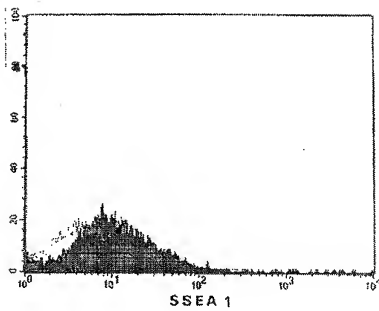
【図8】

図面代用写真



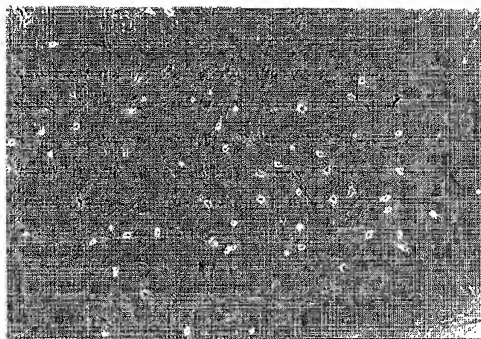
【図9】

図面代用写真



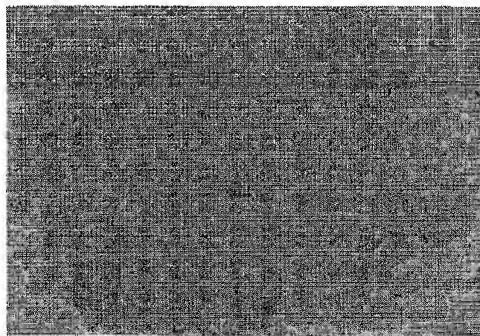
【図10】

図面代用写真

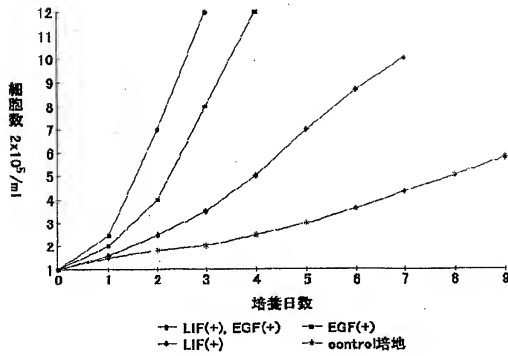


【図11】

図面代用写真



【図12】



【図13】

図面代用写真

